SYMBOLAE BOTANICAE UPSALIENSES V:2
ARBETEN FRÅN BOTANISKA INSTITUTIONERNA I UPPSALA
UTGIVNA AV PROF. N. SVEDELIUS OCH PROF. E. MELIN

CENOCOCCUM GRANIFORME

ALS MYKORRHIZABILDNER VON WALDBÄUMEN

VON

DANIEL LIHNELL

UPPSALA
A.-B. LUNDEQUISTSKA BOKHANDELN
(I DISTRIBUTION)

UPPSALA 1942
ALMQVIST & WIKSELLS BOKTRYCKERI-A.-B.
42370

Der sklerotienbildende Bodenpilz *Cenococcum graniforme* (Sow.) Ferd. et Winge ist zwar seit langem bekannt, hat aber bisher ziemlich wenig Beachtung gefunden. Von der vorzüglichen monographischen Studie abgesehen, die FERDINANDSEN & WINGE diesem Pilz gewidmet haben, wird er in der neueren Literatur nur flüchtig behandelt.

Meine Aufmerksamkeit wurde auf diesen eigenartigen Organismus gelenkt, als ich nach Pilzformen suchte, die mit einem anderen eigenartigen, sterilen Bodenmyzel, nämlich *Mycelium Radicis atrovirens* (MELIN 1923), in Zusammenhang stehen könnten. Nähere Untersuchungen ergaben freilich, dass *C. graniforme* und *M. R. atrovirens* nichts miteinander zu tun hatten, aber auch, dass ersteres in anderer Hinsicht so viel Interessantes darbot, dass es verlockend erschien, diesen Pilz weiter experimentell zu erforschen. Im Nachstehenden berichte ich über die Ergebnisse meiner hauptsächlich in den Jahren 1935—1938 im Botanischen Laboratorium zu Uppsala betriebenen Studien über *C. graniforme.* Eine vorläufige Mitteilung habe ich früher in anderem Zusammenhang veröffentlicht (LIHNELL 1939, S. 122 ff.).

Herrn Prof. Dr. E. MELIN, meinem hochverehrten Lehrer und Freund, spreche ich hier meinen herzlichen Dank aus für das grosse Interesse, das er dieser Untersuchung stets entgegengebracht hat.

I. Reinkultur von *Cenococcum*-Myzelien.

FERDINANDSEN & WINGE geben auf Grund von Beobachtungen in der Natur eine detaillierte Beschreibung der Keimung der *Cenococcum*-Sklerotien; sie scheinen aber nicht versucht zu haben, den Pilz in Reinkultur zu züchten. Dass er jedoch ohne grössere Schwierigkeiten auch im Laboratorium zum Wachsen gebracht werden kann, ging schon aus meinen ersten Versuchen mit diesem Pilz hervor, und ich habe seitdem mehrere Stämme verschiedener Herkunft in Reinkultur gezüchtet. In sämtlichen Fällen gelangte nachstehende einfache Methodik zur Anwendung.

Die Sklerotien wurden in mehrmals gewechseltem Wasser gewaschen und mit einem harten Pinsel gebürstet, durch Eintauchen in 0,1 %ige Sublimatlösung an der Oberfläche sterilisiert, in dreimal gewechseltem sterilem Wasser

gespült und, ganz oder in kleinere Stücke zerteilt, auf Malzextraktagar (2,5 % Malzextrakt, 1,5 % Agar-Agar) bei einer Temperatur von etwa 25° C in Petrischalen oder Freudenreichkolben gebracht. 30 Sekunden langes Eintauchen in die Sublimatlösung schien die Sklerotien in keiner Weise schädlich zu beeinflussen und entfernte in der Regel alle fremden Organismen.

Insgesamt wurden vier verschiedene *Cenococcum*-Stämme gezüchtet, die hier mit ihrer Journalnummer bezeichnet sind:

Stamm 110. Reingezüchtet im April 1935 aus Sklerotien aus Dänemark, Böllemosen (in der Nähe von Kopenhagen), leg. N. F. BUCHWALD, den 23.3.1935.

Stamm 116. Reingezüchtet im August 1935 aus Sklerotien aus Schweden, Uppland, Kirchspiel Lena, Storvreta, Nadelmischwald, leg. S. VON MALMBORG, den 17.6.1935.

Stamm 126. Reingezüchtet im März 1936 aus Sklerotien aus Schweden, Uppland, Kirchspiel Bondkyrko, Fichtenwald bei Norby, leg. Verf. den 13.11.1935.

Stamm 206. Reingezüchtet im September 1937 aus Sklerotien aus Schweden, Uppland, Kirchspiel Bondkyrko, Kiefernwald in Nåsten, leg. Verf. den 29.8.1937.

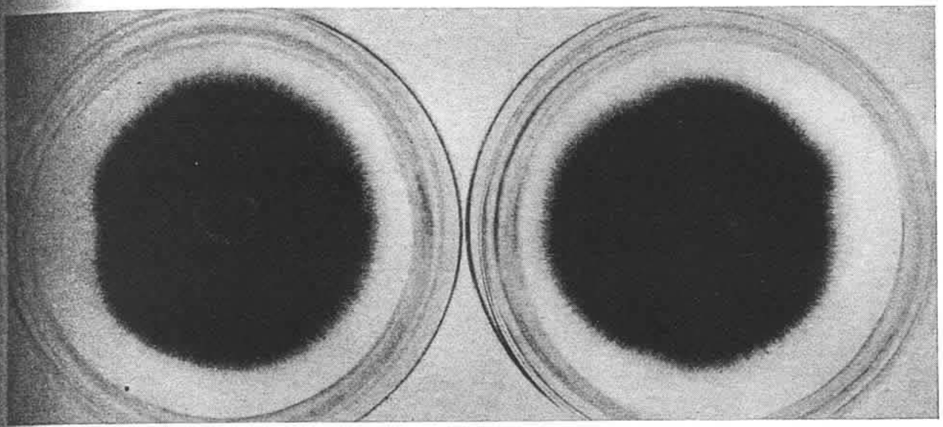
Die Sklerotien wurden nach der Einsammlung in Glasröhrchen bei Zimmertemperatur trocken aufbewahrt. Wie aus den oben angegebenen Daten hervorgeht, behalten derart aufbewahrte Sklerotien wenigstens 4 Monate (Stamm 126) ihre Lebensfähigkeit, und wahrscheinlich können sie erheblich länger liegen, ohne ihre »Keimfähigkeit» zu verlieren.

II. *Cenococcum graniforme* in Reinkultur.

In der Regel wuchsen die ersten Hyphen nach 10—12 Tagen aus den Sklerotien heraus, in einem Fall aber konnte man die Keimung bereits nach 4 Tagen notieren, und in einem anderen Fall lagen einige von den Sklerotien 1—2 Monate auf Malzextraktagar, ehe sich die ersten Lebenszeichen bemerkbar machten. Die Wachstumsgeschwindigkeit der herauswachsenden Hyphen war in sämtlichen Fällen ziemlich gering und hörte nach einiger Zeit fast gänzlich auf. Bei Stamm 116 waren die herauswachsenden Hyphen beispielsweise noch nach 47 Tagen bei Zimmertemperatur nur etwa 1 mm lang. Durch Übertragen der hyphenbewachsenen Sklerotien auf flüssiges Substrat (2,5 %ige Malzextraktlösung oder »Zucker-Salzlösung» mit 0,25 % Malzextrakt, durch Berkefeld- oder Seitzfilter filtriert) konnte das Wachstum jedoch wieder in Gang gebracht werden. Während der weiteren Kultur abwechselnd auf festem and flüs-

sigem Substrat nahm die Wachstumsgeschwindigkeit erheblich zu, obzwar sie immer noch als langsam bezeichnet werden muss.

Nicht nur was die Wachstumsgeschwindigkeit anlangt, sondern auch in bezug auf das habituelle Aussehen der Kolonien und die Morphologie der Hyphen sind sich die vier Stämme sehr ähnlich. In jungem Stadium sind die Kolonien auf Agarsubstrat durch den sammetartigen Glanz des Luftmyzels und die rabenschwarze Farbe (Fig. 1) gekennzeichnet, wodurch sie sich scharf von den ins Grau, Braun oder Grün spielenden Schattierungen unterscheiden, die man in den meisten Fällen bei »schwarzen»



a *b*

Fig. 1. *Cenococcum graniforme* in Reinkultur, die Stämme 110 (*a*) und 126 (*b*). 65 Tage alte Kulturen. Etwas unter natürlicher Grösse.

Pilzmyzelien antrifft. Die 4—5 μ dicken Lufthyphen sind im Mikroskop bei durchfallendem Licht gelblichbraun bis dunkel schwarzbraun, glatt oder dicht besetzt mit kleinen warzenartigen Gebilden — wahrscheinlich erstarrte Exkrettröpfchen — septiert mit einer Entfernung von 20—60 μ zwischen den Querwänden, sowie auffallend gerade und spärlich verzweigt (Fig. 2). Die Hyphen sind ferner ziemlich spröde und zerbrechen bei Berührung, z. B. mit der Impfnadel, leicht in kleinere Stücke.

Die Hyphenzellen sind durchweg einkernig, und Schnallen kommen nicht vor.

Irgendwelche Vermehrungskörper bilden sich nicht.

Die Hyphen des Substratmyzels unterscheiden sich in ihrem Aussehen nur wenig von den Lufthyphen, anastomosieren und verzweigen sich aber lebhafter. Um das Impfstückchen herum wird das Substratmyzel mehr oder weniger hart und kompakt, bekommt aber nicht den Charakter von Sklerotien im eigentlichen Sinne; wirkliche sklerotische Gebilde ähnlich

denen, die in der Natur vorkommen, habe ich bei den Kulturen niemals beobachtet, wohl aber Ansätze zu solchen. Im Zusammenhang mit den unten (S. 12) beschriebenen Hemmungen des Myzelwachstums ist es nämlich bisweilen vorgekommen, dass aus den Impfstückchen langsam kleine, kugelförmige, feste Gebilde von 1—3 mm Durchmesser mit kompakt pseudoparenchymatischer Struktur von gleichem Aussehen wie die der natürlichen Sklerotien herausgewachsen sind. Die Oberfläche war jedoch mit einem dichten Myzelienpilz bedeckt, und nach einiger Zeit sind die »Sklerotienanlagen» zu normalen Myzelien ausgewachsen.

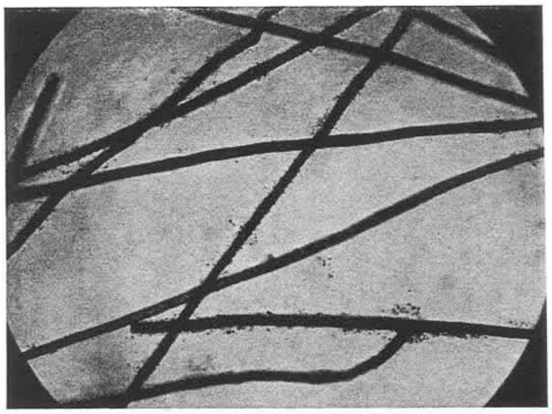
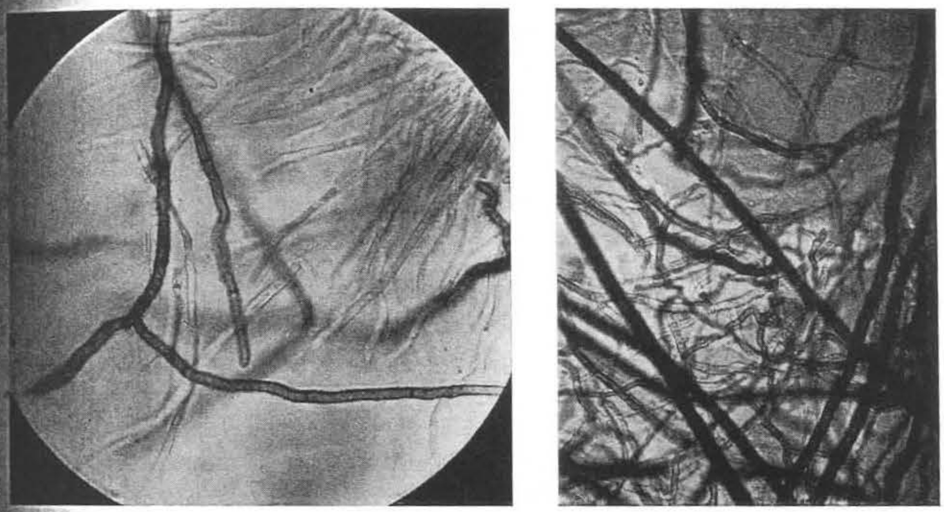


Fig. 2. *Cenococcum graniforme*. Lufthyphen aus einer Kultur auf Malzagar. Zupfpräparat in Wasser. Die geraden, spärlich verzweigten Hyphen sind mit kleinen warzenartigen Gebilden — wahrscheinlich erstarrten Exkrettröpfchen — besetzt, die sich beim Präparieren teilweise losgelöst haben und ins Wasser gelangt sind. Vergr. × 230.

Auch in den für das blosse Auge ganz schwarzen Myzelien färben sich einige von den Hyphenspitzen — wahrscheinlich die, die sich in lebhaftem Wachstum befinden — nur schwach oder sind rein hyalin; insbesondere bezieht sich dies auf die Substrathyphen. Es scheint, als bildete sich der schwarze Farbstoff erst dann, wenn die Zelle ein gewisses Stadium der Entwicklung erreicht hat. Dann und wann kommt es aber vor, dass die Farbstoffbildung in den nach dem Überimpfen neu ausgewachsenen Hyphen sich erheblich verzögert, und man erhält mehr oder weniger rein weisse Myzelien, bei denen die Hyphen im übrigen jedoch typische *Cenococcum*-Merkmale haben (Fig. 3 *a*). Die dabei entstandenen »Albino»-Kolonien werden allmählich dunkler, und das Endergebnis ist regelmässig ein Myzel mit der normalen rabenschwarzen Farbe. Diese Störungen der Farbstoffbildung treten mit unregelmässigen Zwischenräumen bei allen vier Stämmen und unabhängig von der Art des Sub-

strates auf. Eine bestimmte äussere Veranlassung des Phänomens habe ich nicht nachweisen können.

Der bei älteren Kolonien regelmässig vorkommende graue Farbton steht in keinem direkten Zusammenhang mit diesem »Albinismus». Die graue Farbe ist darauf zurückzuführen, dass sich aus Lufthyphen mit normalem Aussehen andere, dünnere, unregelmässige und stärker verzweigte Hyphen entwickeln, die mehr oder weniger hyalin sind (Fig. 3 *b*). Dieser Hyphentypus tritt bei Züchtung sowohl auf festem Substrat wie auf Nährlösungen auf und kehrt so regelmässig wieder, dass er fast als



a *b*

Fig. 3. *Cenococcum graniforme*. *a*. Hyaline Hyphen aus einer jungen »Albino»-Kolonie, sowie normal gefärbte Hyphen. *b*. Zupfpräparat von Luftmyzel aus einer älteren Kolonie. Zwischen Hyphen normalen Aussehens sieht man von diesen herauswachsende hyaline, dünne, unregelmässig geformte und lebhafter verzweigte Hyphen. — Vergr. × 250.

eine normale Alterserscheinung zu betrachten ist. Vielleicht steht er damit im Zusammenhang, dass das Substrat in dieser oder jener Hinsicht völlig ausgenutzt worden ist; die schmalen hyalinen Hyphen wären m. a. W. eine Hungerform. Impft man von einem solchen ergrauten Teil einer älteren Kolonie auf frisches Substrat über, so erhält die neue Kolonie wieder die für junge Myzelien charakteristische Farbe und Hyphen normalen Aussehens.

III. Anastomosierungsversuche.

Unter Anwendung einer Methodik, die früher in anderm Zusammenhang beschrieben worden ist (LIHNELL 1939, S. 98), untersuchte ich die Tendenz der vier Stämme, vegetative Anastomosen miteinander zu bilden. Die Myzelien wurden zu zweien nach folgendem Schema kombiniert: 110 + 116, 110 + 126, 110 + 206, 116 + 126. Abgesehen davon, dass Stamm 206 nicht mit den Stämmen 116 und 126 zusammengebracht wurde, wurden also alle denkbaren Kombinationen vorgenommen. Die Myzelien wuchsen in den Deckglaskulturen sehr langsam, nach 2—3 Wochen aber hatte in sämtlichen Kulturen eine mehr oder weniger lebhafte Anastomosenbildung zwischen den miteinander kombinierten Myzelien stattgefunden. Nach dem, was von den vegetativen Hyphenanastomosen und den Voraussetzungen für ihre Entstehung bekannt ist (vgl. BULLER und daselbst zit. Autoren), ist das Ergebnis dieser Anastomosierungsversuche als ein weiterer Ausdruck der nahen Verwandtschaft zwischen den vier Stämmen zu betrachten, für die schon die auffallenden Übereinstimmungen in äusserer Hinsicht sprechen.

IV. *Cenococcum graniforme* als Mykorrhizapilz.

Durch seinen Charakter eines Bodenpilzes und gewisse hervortretende Eigenschaften der reingezüchteten Myzelien — das langsame Wachstum, die Abwesenheit von Vermehrungskörpern und die, insbesondere anfangs bemerkbare, Abneigung, auf gewöhnlichen Laboratoriumsubstraten zu wachsen — erinnert *C. graniforme* an die Pilzsymbionten der ektotrophen Mykorrhizen der Waldbäume. Meine Vermutung, dass *C. graniforme* auch ein Mykorrhizabildner sein könnte, bestätigte sich ferner bei der Feststellung der Übereinstimmung zwischen dem aus gewissen schwarzen Nadelbaummykorrhizen isolierten *M. R. nigrostrigosum* (HATCH) und den *Cenococcum*-Myzelien (worüber Weiteres unten). Es erschien daher natürlich, das Verhalten von *C. graniforme* zu einigen der in unserem Lande gewöhnlichen Waldbäume, in erster Linie *Pinus silvestris* und *Picea Abies*, zu untersuchen. Gründe, die ich früher ausführlich dargelegt habe (LIHNELL 1939), veranlassten mich ferner zu prüfen, ob *C. graniforme* nicht auch die Rolle eines Mykorrhizabildners bei *Juniperus communis* spielen könne, in dessen Wurzelsystem neben der normalen endotrophen Infektion ausnahmsweise ektotrophe Mykorrhizen vorkommen. In einigen späteren Versuchsreihen wurde der Pilz zudem mit noch einigen Bäumen und Sträuchern kombiniert.

A. Syntheseversuche.

Für die Syntheseversuche habe ich MELINS Methodik angewandt (MELIN 1923, 1936), nach welcher die vermuteten Symbionten zusammen auf Sand und Nährlösung in Glaskolben gezüchtet werden. Nachstehend wird eine kurze Beschreibung der Syntheseversuche gegeben.

Pinus silvestris L. Es wurden insgesamt vier Kulturen von *Pinus silvestris* mit *Cenococcum* geimpft. In drei von den Kulturen hörte der Pilz sehr bald zu wachsen auf. In der vierten war das Wachstum des Pilzes besser und einer der oberen Wurzelzweige dicht von Myzel umsponnen. Sämtliche Kurzwurzeln an diesem Teil des Wurzelsystems waren zu Mykorrhizen umgebildet (Tafel I: 1; Tafel II: 4—5). Die Mykorrhizen waren einfach oder gabelförmig verzweigt, ihre Farbe war schwarz, und sie hatten grobe, von der Oberfläche mehr oder weniger reichlich ausstrahlende Hyphen. Der Mantel zeigte die charakteristische, netzförmige Strahlung, wie sie ursprünglich von MELIN (1927, S. 451) bei gewissen Kiefernmykorrhizen beschrieben und später von HATCH in *M. R. nigrostrigosum*-Mykorrhizen wiedergefunden wurde. Das Hartigsche Netz war dünn und hyalin.

Picea Abies (L.) Karst. Von sechs mit *C. graniforme* geimpften Kulturen zeigten nur drei Wachstum des Pilzes. In einem dieser Fälle war das Wachstum recht schwach, das Myzel hatte nur einige der oberen Seitenwurzeln erreicht, die von einem spärlichen Hyphennetz umsponnen waren, und eine Mykorrhizabildung war nicht zustande gekommen. In den beiden anderen Kulturen war die Entwicklung des Pilzes sehr gut und das ganze Wurzelsystem von Myzel umgeben. Trotzdem fand sich in der einen der beiden Kulturen nicht die geringste Tendenz zu Mykorrhizabildung. In der anderen dagegen waren mehrere der Kurzwurzeln zu Mykorrhizen umgebildet. Dies waren teils Mykorrhizen des nämlichen Aussehens wie die oben bei Kiefern beschriebenen (Tafel II: 1), teils unvollständige Mykorrhizen mit einem Mantel, aber ohne das Hartigsche Netz. Zudem kamen mantelartige Gebilde vor, aufgebaut aus unregelmässig angehäuften Hyphenmassen und ohne die gewöhnliche Netzstruktur. Die meisten Seitenwurzeln zeigten im übrigen, trotzdem sie reichlich von Hyphen umsponnen waren, nicht die geringste Andeutung einer Mykorrhizabildung.

Juniperus communis L. In fünf von insgesamt zehn Kulturen gelangen die Impfungen einwandfrei. Trotzdem die Myzelien ein gutes Wachstum zeigten, waren die Wurzeln meistens nur von spärlichen Hyphennetzen umsponnen. Diese konnten sich hier und da zu »Pseudomänteln» des

nämlichen unregelmässigen Typus, wie er auch bei Fichten vorkam, verdichten, und in einem einzigen Fall zeigte ein derartiger Pseudomantel eine Andeutung eines regelmässigeren Netzmusters. Nicht selten war der Pilz in und zwischen die Zellen der beiden hypodermalen Zellschichten eingedrungen und hatte sie mit kompakten pseudoparenchymatischen Hyphenmassen gefüllt. Typische Mykorrhizen hatten sich in keinem Fall gebildet.

Betula verrucosa Ehrh. Zwei Kulturen wurden mit *C. graniforme* ge-

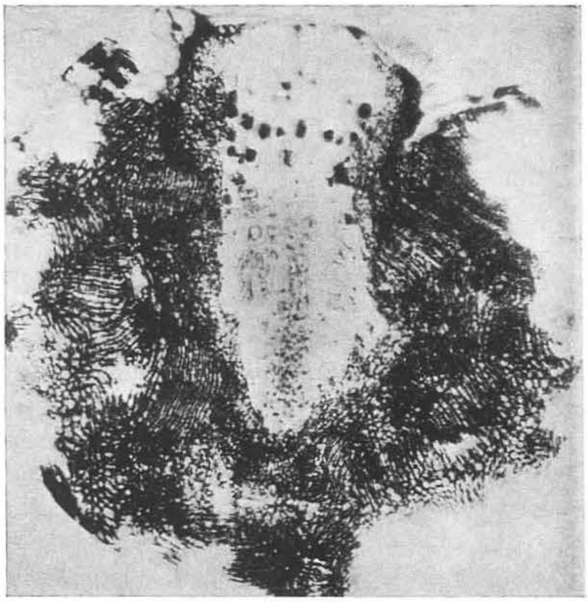


Fig. 4. Aus *Cenococcum* gebildeter, abnorm dicker Hyphenmantel um eine Seitenwurzel von *Salix repens*. Vergr. × 140.

impft. In der einen wuchs der Pilz nicht aus, in der anderen war die Entwicklung des Myzels gut und, praktisch gesehen, jede Kurzwurzel sowie die Spitzen der Langwurzeln zu Mykorrhizen umgebildet (Tafel I: 3; Tafel II: 2). Die Mäntel hatten das nämliche charakteristische Aussehen wie bei den Kiefern- und Fichtenmykorrhizen, und das Hartigsche Netz war gut entwickelt.

Populus tremula L. Nur in einer der fünf geimpften Kulturen wurde eine nennenswerte Entwicklung des Myzels erzielt. Alle von den Hyphen erreichten Kurzwurzeln und die Spitzen der Langwurzeln waren in dieser Kultur jedoch zu Mykorrhizen umgebildet, die in Aussehen und Entwicklungsgrad an Birkenmykorrhizen erinnerten (Tafel I: 4; Tafel II: 3).

Salix caprea L. Trotz einer verhältnismässig guten Entwicklung des Myzels in sämtlichen fünf geimpften *S. caprea*-Kulturen kam keine Mykorrhizabildung vor. Sowohl die kleineren Seitenwurzeln wie die kräftigeren Wurzelzweige waren von unregelmässigen »Pseudomänteln» umgeben, von denen die Hyphen bisweilen in die oberflächlichen Zellschichten der Wurzeln eingedrungen waren.

Salix repens L. Die Syntheseversuche mit dieser Pflanze fielen im grossen ganzen ebenso aus wie die mit *S. caprea.* Die Infektionen der peripheren Wurzelzellschichten waren jedoch kräftiger, und in zwei Fällen fand sich um eine kurze Seitenwurzel herum ein äusserst dicker Mantel von ausgeprägter Netzstruktur (Fig. 4). Die von Hyphenmassen bis zum Bersten gefüllten Parenchymzellen und das Fehlen des Hartigschen Netzes zeigen jedoch, dass diese Gebilde nicht als Mykorrhizen im eigentlichen Sinne zu betrachten sind.

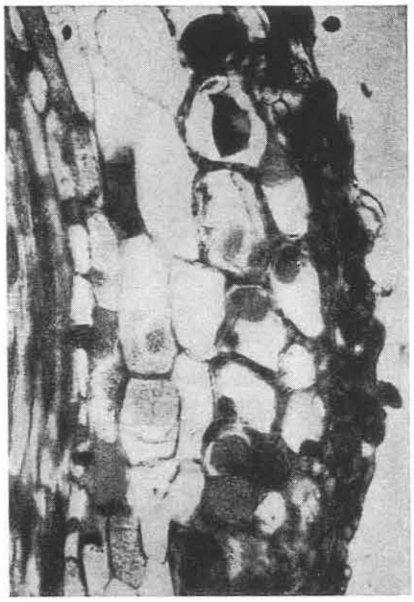


Fig. 5. Experimentell hervorgerufene *Cenococcum*-Mykorrhiza bei *Tilia cordata.* Med. Längsschn. Vergr. × 450.

Tilia cordata Mill. In einer einzigen von den vier, bei zwei verschiedenen Gelegenheiten angelegten Kulturen wuchs der Pilz genügend aus. Die Hyphen umspannen reichlich die oberen Teile des Wurzelsystems, von dem wenigstens zwei Seitenwurzeln zu Mykorrhizen umgebildet waren, die sowohl einen Mantel als das Hartigsche Netz aufwiesen (Tafel I: 2; Textfig. 5). Der Mantel, der die charakteristische netzförmige Strahlung zeigte, war jedoch verhältnismässig dünn und ungleichmässig ausgebildet. Ansätze zu einer wirklichen Mykorrhizabildung kamen übrigens, auch an den Langwurzeln, hier und da vor, ausserdem »Pseudomäntel» und oberflächliche intrazellulare Hyphenanhäufungen.

Alnus glutinosa Gaertn. Insgesamt 10 Kulturen wurden bei verschiedenen Gelegenheiten geimpft, aber nur in vier von ihnen erhielt man eine Entwicklung des Myzels. Die ziemlich spärlich umsponnenen Wurzeln zeigten hier und da oberflächliche intrazellulare Infektionen. Eine Mykorrhizabildung kam nicht vor.

B. Besprechung der Versuchsresultate.

In der obigen Beschreibung der Versuche kehren bei jeder Versuchspflanze Angaben darüber wieder, wie die Impfungen der Synthesekulturen ausgefallen waren. Ich habe diese, wie es scheinen kann, unwesentlichen Einzelheiten besonders dargelegt, weil sie einen für den Pilz äusserst charakteristischen Umstand beleuchten, dass er nämlich bei Überimpfung auf ein neues Substrat in bemerkenswert grossem Ausmass nicht auswächst oder in seiner Entwicklung sehr bald stehenbleibt. Das Phänomen ist besonders häufig in den Synthesekulturen aufgetreten, ist aber auch bei Überimpfungen auf Agarsubstrat keineswegs ungewöhnlich. Eine bestimmte Ursache dieser »Launenhaftigkeit» des Pilzes ist schwer anzugeben. Die vier *Cenococcum*-Stämme verhalten sich alle gleich, und das Phänomen scheint unabhängig davon aufzutreten, ob das Impfmaterial älteren oder ganz jungen Stammkulturen entnommen ist. Wie die erwähnte grössere Frequenz misslungener Impfungen in den Synthesekulturen zeigt, spielt die Beschaffenheit des neuen Substrates, obzwar erst in zweiter Linie, offenbar eine gewisse Rolle. Das Vorkommen von »Sklerotienanlagen» im Zusammenhang mit diesen Hemmungszuständen kann vielleicht darauf hindeuten, dass man es hier mit einer durch das Kulturmilieu modifizierten Äusserung einer natürlichen Periodizität mit abwechselnden Wachstums- und Ruhestadien zu tun hat. Es liesse sich auch vielleicht denken, dass es unter den für den Pilz weniger günstigen Kulturverhältnissen (vgl. die nur allmählich vor sich gehende Anpassung an das Kultursubstrat!) die Regel ist, dass Teile der Myzelkolonien in einem frühen Stadium absterben oder in einen Zustand herabgesetzter Vitalität geraten, was zur Folge hat, dass ein erneutes Wachstum ausgeschlossen ist oder stark gehemmt wird.

Als ein unbestreitbares Resultat der Syntheseversuche ergibt sich, dass *Cenococcum graniforme* als Mykorrhizabildner bei *Pinus silvestris*, *Picea Abies*, *Betula verrucosa*[1], *Populus tremula* und *Tilia cordata* auftreten kann. Die Mykorrhizen waren durchgehend von dem Typus, den BJÖRKMAN im Anschluss an MELIN (1927) und HATCH »Dn»-Mykorrhizen genannt hat, und der in der Natur nicht selten, wenigstens bei den vier zuerst erwähnten Bäumen angetroffen wird. Was *T. cordata* anlangt, so sind die mykotrophen Verhältnisse sowohl

[1] Im Zusammenhang hiermit sei erwähnt, dass FERDINANDSEN & WINGE abgestorbene, natürliche Birkenmykorrhiza völlig mit *C.*-Sklerotien inkrustiert angetroffen haben, weshalb sie auf die Möglichkeit hinweisen, dass *C.* »occasionally enters into connection also with living tree roots, accessorily in the mycorrhiza sheath or otherwise», eine Vermutung, deren Richtigkeit hier also bestätigt wird.

dieser Art wie der *T.*-Arten überhaupt wenig bekannt und meines Wissens bisher nicht Gegenstand einer experimentellen Untersuchung gewesen. *C. graniforme* dürfte also der erste mit Sicherheit festgestellte Mykorrhizapilz der Gattung *Tilia* sein.

Es ist natürlich ein heikles Unterfangen, bei dem Vorsicht geboten ist, nach so wenigen Kulturen, wie sie mir zur Verfügung gestanden haben, eine nähere Charakteristik des Zusammenhanges zwischen dem Pilz und den verschiedenen Wirtspflanzen zu geben. Man hatte bei der Untersuchung der Kulturen jedoch den Eindruck, dass die Wirtspflanzen unter den gegebenen Versuchsbedingungen ziemlich verschiedene Voraussetzungen für die Mykorrhizabildung darboten. Eine Gruppe bilden *Betula verrucosa* und *Populus tremula*, bei denen, praktisch gesehen, jede vom Pilz angegriffene Kurzwurzel oder Langwurzelspitze in Mykorrhiza umgewandelt worden ist. *Pinus silvestris* schliesst sich diesen zwei am nächsten an. Bei *Picea Abies* hatten sich dagegen, trotzdem die beiden Kontrahenten gut entwickelt waren, nur einige Mykorrhizen im eigentlichen Sinne sowie vereinzelte unvollständige Stadien gebildet; im übrigen waren die Wurzeln von spärlichen Hyphennetzen, hier und da zu unregelmässigen »Pseudomänteln» verdichtet, umsponnen. Ein ähnliches, sichtlich labiles und unbestimmtes Verhältnis zwischen Pilz und Wirtspflanze war in den *Tilia*-Kulturen wahrnehmbar; die Anzahl der Mykorrhizen war gering, ihre Hyphenmäntel locker und ungleichmässig ausgebildet, und allerlei Übergänge zwischen wirklichen Mykorrhizen und unregelmässigeren Verbindungen zwischen dem Pilz und den Wurzeln kamen vor.

Als eine letzte Gruppe könnte man diejenigen der Versuchspflanzen aufstellen, mit denen keine Mykorrhizabildung zustande kam. Bei ihnen allen zeigte der Pilz eine gewisse Neigung zu Endoparasitismus, indem er in die peripheren Wurzelzellschichten eindrang und im übrigen die Wurzeln mit mehr oder weniger undifferenzierten Hyphenüberzügen wechselnder Mächtigkeit umgab. Was *Alnus glutinosa* anlangt, so ist hier wenig mehr hinzuzufügen. Bei *Juniperus communis* und den beiden *Salix*-Arten war in den unregelmässig ausgebildeten Hyphenüberzügen um die Wurzeln herum eine Tendenz zu der nämlichen charakteristischen Anordnung der Hyphen, die die Hyphenmäntel der *Cenococcum*-Mykorrhizen auszeichnet, wahrzunehmen, eine Tendenz, die — bei *J. communis* schwach, bei *S. caprea* etwas stärker hervortretend — bei *S. repens* in der Anlage eines wirklichen, zusammenhängenden Hyphenmantels, wenn auch von hypertrophischen Dimensionen, ihren Höhepunkt erreichte. Besonders in dem letzten Fall ist der Schritt zu einer Konstituierung vollständiger Mykorrhizen nicht weit, und ich halte es für wahrscheinlich, dass *C. graniforme* bei allen diesen Arten als Mykorrhizasymbiont auftreten kann,

obzwar die Synthesekulturen nicht die richtigen Bedingungen hierfür darboten. Es sei erwähnt, dass in der Natur schwarze *Alnus*-Mykorrhizen beobachtet worden sind, wo *C. graniforme* aller Wahrscheinlichkeit nach der Symbiont war, und zwar bei *A. firma* var. *Sieboldiana* (Masui; vgl. Hatch) und bei *A. glutinosa* (Fil. lic. E. Björkman, Uppsala, mündlich mitgeteilt). Was insbesondere *J. communis* anlagt, so treten bei dieser Pflanze in der Natur ektotrophe Mykorrhizen auf, die in bezug auf Farbe, Struktur des Mantels und Aussehen der ausstrahlenden Hyphen von deutlichem *Cenococcum*-Typus sind (Lihnell 1939). Sofern es nicht mehrere Pilze gibt, die Mykorrhizen dieses eigenartigen Typus bilden — und dies dürfte wenig wahrscheinlich sein — muss man daher ohne weiteres damit rechnen, dass *C. graniforme* ein Mykorrhizasymbiont von Wacholder ist. Das ausnahmsweise Vorkommen derartiger Mykorrhizen im Wurzelsystem des Wacholders und die mitunter unvollständige Ausbildung der Mykorrhizen sprechen jedoch dafür, dass diese nur unter ganz besonderen und selten vorliegenden Bedingungen zustande kommen, ein Umstand, der auch das Resultat der Syntheseversuche erklären könnte.

V. *Cenococcum graniforme* und *M. R. nigrostrigosum.*

Bereits als ich das erste Mal die aus den *Cenococcum*-Sklerotien herauswachsenden Myzelien sah, fiel es mir auf, wie gut Hatchs Beschreibung von *M. R. nigrostrigosum* mit diesen Gebilden übereinstimmte. Die ferneren Untersuchungen bestätigten des weiteren, dass hier eine so vollständige Übereinstimmung vorlag, dass man von Identität sprechen konnte. In jeder Einzelheit findet man bei den *Cenococcum*-Myzelien die Züge, die Hatch als kennzeichnend für *M. R. nigrostrigosum* anführt: die eigenartige tiefschwarze Farbe (»jet-black»), den Sammetglanz der Kolonien (»a colony resembles a bit of black velvet»), die geraden, spröden Hyphen (»the erect, bristly character of the emerging hyphae»), die Abwesenheit von Schnallen (»clamp connections have not been observed»), die anfänglich bemerkbare Abneigung, auf künstlichem Substrat zu wachsen (»the sensitiveness of the organism to cultural media»), die geringe Wachstumsgeschwindigkeit (»its minute rate of growth»)[1] und die Entwicklung hyaliner Hyphenformen in älteren Kulturen (»In old cultures on exhausted malt extract the new growth is hyaline»). Hatch gibt den

[1] Dass Hatch und ich etwas verschiedene Werte der Wachstumsgeschwindigkeit bei unseren Myzelien erhalten haben — 40—45 mm in 30 Tagen, bzw. 45 mm in 65 Tagen — hat in diesem Fall weniger zu bedeuten, denn einerseits ist die Wachstumsgeschwindigkeit eines Myzels keineswegs eine absolut konstante Grösse, anderseits wurden die Messungen unter verschiedenen äusseren Bedingungen (Temperatur, Substrat usw.) ausgeführt.

Durchmesser der Hyphen auf 4—5 μ an; dieselben Masse habe ich bei *Cenococcum* erhalten. Auch eine solche Eigenschaft wie die im Obenstehenden berührte »Launenhaftigkeit» bei Überimpfungen ist bei *M. R. nigrostrigosum* wahrnehmbar; von seinen Syntheseversuchen mit diesem Myzel sagt HATCH nämlich, dass in den meisten Kulturen »the inocula failed to grow». Hierzu kommt, dass die beiden Myzelien als Mykorrhizasymbionten auftreten und in Syntheseversuchen mit Waldbäumen ektotrophe Mykorrhizen mit demselben charakteristischen, vom Pilz bedingten Gepräge gebildet haben, nämlich: die schwarze Farbe, die groben, reich ausstrahlenden Hyphen und vor allen Dingen die eigenartige Netzstruktur des Mantels, die unabhängig davon, wer der höhere Symbiont ist, unverändert auftritt.

Leider war mir HATCHS Originalkultur von *M. R. nigrostrigosum* nicht zugänglich, weshalb ich keine direkten okularen Vergleiche oder Anastomosierungsversuche anstellen konnte. Bereits aus dem oben Gesagten dürfte jedoch deutlich genug hervorgehen, dass *C. graniforme* und *M. R. nigrostrigosum* nur verschiedene Namen ein und desselben Organismus sind.[1] »The provisional name» *M. R. nigrostrigosum* muss also in Zukunft vor *C. graniforme*, dem älteren Namen, der die frei lebende Form des Pilzes bezeichnet, zurücktreten.

Es ist HATCH bei seinen Studien über *M. R. nigrostrigosum* gelungen, experimentell nachzuweisen, dass das betreffende Myzel mit *Pinus strobus* und *P. resinosa* Mykorrhizen bildet. Diese zwei *Pinus*-Arten einberechnet, hat es sich also bestätigt, dass insgesamt sieben, zu fünf systematisch teilweise weit verschiedenen Gattungen gehörende, Arten Wirtspflanzen für *C. graniforme* sind. Wenn dieser Sachverhalt auch an und für sich genügt, um den Pilz als den am meisten polyphagen aller bisher bekannten Mykorrhizabildner zu bezeichnen, so sind doch die Voraussetzungen dafür vorhanden, dass das Verzeichnis seiner Wirtspflanzen mit der Zeit erheblich grösser wird. Eine dieser Voraussetzungen ist die Polyphagie des Pilzes, eine andere sein allgemeines Vorkommen. In der Literatur mitgeteilte Funde von *Cenococcum*-Sklerotien geben trotz ihrer verhältnismässig geringen Anzahl Belege für eine äusserst weit ausgedehnte geographische Verbreitung, und aus der Studie von FERDINAND-

[1] Obzwar für die Beweisführung kaum notwendig, sei hier doch erwähnt, dass ich später aus schwarzen Fichten- und Kiefernmykorrhizen vom »Dn»-Typus Myzelien isoliert habe, die untereinander völlig gleich und von unzweideutigem *M. R. nigrostrigosum*-Charakter waren. Das von Kiefer isolierte Myzel (das Fichtenmyzel wurde nicht untersucht), welches bei Syntheseversuchen ohne Schwierigkeiten Mykorrhizen vom Dn-Typus bei Kiefern bildete, anastomosierte leicht mit den *Cenococcum*-Stämmen 110 und 206, weshalb seine Identität mit *C. graniforme* keinem Zweifel Raum lässt.

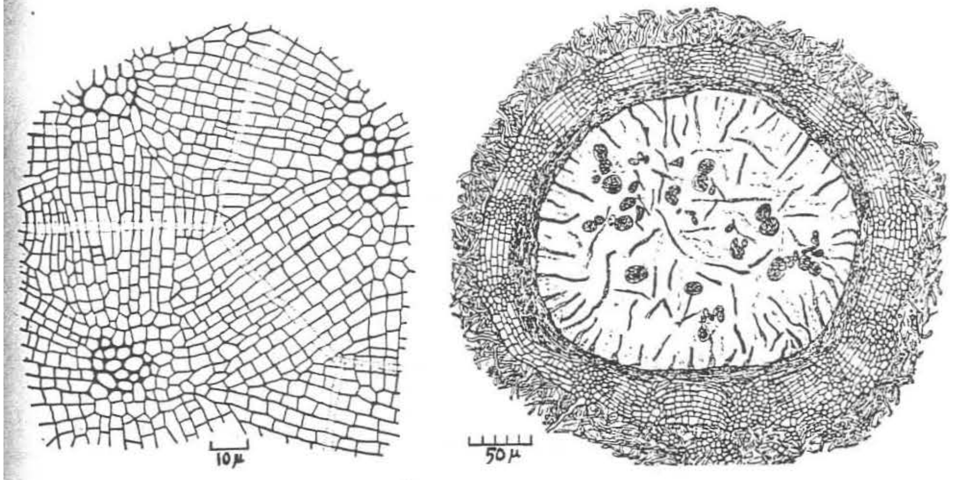
SEN & WINGE geht hervor, dass *C. graniforme* in Pflanzengesellschaften sehr wechselnder Zusammensetzungen auftreten kann. Der Pilz kommt folglich mit einer grossen Anzahl Arten Mykorrhiza-führender Bäume und Sträucher in Verbindung, und es ist zu erwarten, dass er als wenig spezialisiert mit mehreren von ihnen eine Symbiose eingeht.[1] HATCH hebt unter Hinweis u. a. auf MASUI und eigene Beobachtungen hervor, dass »*Nigrostrigosum*»-Mykorrhizen in so verschiedenen Teilen der Welt wie Schweden, U. S. A. und Japan vorkommen, und zählt nicht weniger als 11 Gattungen auf, bei deren nordamerikanischen Repräsentanten er in der Natur Mykorrhizen vom »*Nigrostrigosum*»-Typus gefunden hat. HATCHS Vermutung, dass der Pilz »apparently forms mycorrhizae with the majority of woody plants possessing ectotrophic mycorrhizae», dürfte auch sehr gut den wirklichen Sachverhalt angeben.

VI. Ist *Cenococcum graniforme* ein Ascomycet?

Eine sexuale Phase von *Cenococcum* ist nicht bekannt, und der Pilz bildet weder Sporen noch Konidien. FERDINANDSEN & WINGE (S. 375) ziehen auch den Schluss, dass »the species is undoubtedly a *Sclerotium* also in systematic respects, and like several other species — — — produces only mycelium and sclerotia». Wie nun die Dinge liegen, so ist es, obzwar vielleicht aussichtslos, doch recht verlockend, weitere Betrachtungen über die systematische Stellung des Pilzes anzustellen und zu erforschen, was *Cenococcum* »eigentlich» ist. Es sollte wenigstens möglich sein zu bestimmen, zu welcher von den grossen Gruppen der Pilz gehört, ob er ein Ascomycet oder ein Basidiomycet ist. Der Umstand an sich, dass *C. graniforme* ein Mykorrhizabildner ist, könnte vielleicht als ein Hinweis auf seinen Charakter als Basidiomycet anzusehen sein; bei allen sonstigen Fällen, in denen es bisher gelungen ist, einwandfrei zu beweisen, dass ein Pilz ein Mykorrhizabildner ist, hat es sich um Basidiomyceten gehandelt; die Fähigkeit der Ascomyceten, Mykorrhizen zu bilden, ist dagegen noch immer eine Annahme ohne erforderliche experimentelle Stütze. Ein Indicium, das nach einer ganz anderen Richtung hin deutet, sind die strukturellen Übereinstimmungen zwischen den

[1] Was speziell die schwedischen Verhältnisse anlangt, so liegen Angaben über Funde von *Cenococcum*-Sklerotien ausser bei ELIAS FRIES (siehe auch FERDINANDSEN & WINGE) u. a. bei SERNANDER und ARNBORG vor. Das Vorkommen von »Dn»-Mykorrhizen inverschiedenen Gegenden des Landes wird durch Angaben bei MELIN (1927), HATCH, LINDQUIST und BJÖRKMAN belegt. Aus eigener Erfahrung kann ich selbst bestätigen, dass sowohl *Cenococcum*-Sklerotien wie Mykorrhizen vom Dn-Typus nicht als Seltenheiten zu betrachten sind.

Hyphenmänteln der *Cenococcum*-Mykorrhizen und den Perithecienwänden bei der kleinen *Plectascales*-Gattung *Cephalotheca*. Nachstehende Bilder nach CHESTERS zeigen in den Perithecienwänden die leicht erkennbare netzartige Struktur mit kleinen Gruppen rundlicher »Zellen» mit verdickten Wänden, die durch tangential verlaufende Hyphen getrennt sind. Sowohl der Flächenschnitt (Fig. 6 *a*) wie der Querschnitt (Fig. 6 *b*) erinnern ja auffallend an die Hyphenmäntel der Mykorrhizen (Tafel II; Textfig. 4 und 5. Die Struktur des Mantels geht deutlicher aus Bildern bei HATCH und bei LIHNELL (1939) hervor.). Soweit mir bekannt ist, sind



a *b*

Fig. 6. *a*. *Cephalotheca purpurea*. Flächenschnitt der Perithecienwand. *b*. *C. sulphurea*. Querschnitt des Peritheciums. — Nach CHESTERS.

diese Wandstrukturen etwas Spezifisches für *Cephalotheca* und treten nicht bei sonstigen Ascomyceten oder überhaupt bei anderen Pilzen als bei *Cenococcum* auf. Bedeutet dies nun eine nähere Verwandtschaft zwischen *Cenococcum* und *Cephalotheca*? Oder handelt es sich nur um eine Konvergenzerscheinung ohne tiefere systematische Bedeutung? Es muss im Interesse der Objektivität betont werden, dass die Sklerotien — also die, wenigstens oberflächlich gesehen, am meisten perithecienartigen Organe von *Cenococcum* — die in Rede stehenden Strukturen nicht besitzen, sowie auch, dass die vegetativen Myzelien der *Cephalotheca*-Arten nicht die geringste Ähnlichkeit mit den *Cenococcum*-Myzelien aufweisen. Diese beiden Umstände sprechen vielleicht in erster Linie für eine Bejahung dieser letzten Frage. Ein definitiver Bescheid auf eine dieser Fragen ist indes wohl nicht zu bekommen, jedenfalls nicht bei dem jetzigen Stand

unserer Kenntnisse. Ich habe jedoch die Aufmerksamkeit auf einen Umstand lenken wollen, der vielleicht ein gewisser Fingerzeig sein kann, und der jedenfalls nicht ohne sein Interesse ist.

VII. Zusammenfassung.

1. Myzelien von *Cenococcum graniforme* sind aus Sklerotien von vier Fundorten in Schweden und Dänemark reingezüchtet worden. Das Aussehen und die Wachstumsart der Myzelien während der Kultur wird beschrieben.

2. Die vier *Cenococcum*-Stämme, die morphologisch gut übereinstimmen, lassen sich ohne Schwierigkeit zur Bildung vegetativer Anastomosen miteinander bringen, was als ein Ausdruck der nahen Verwandtschaft zwischen den Stämmen gedeutet wird.

3. Es ist experimentell nachgewiesen worden, dass *C. graniforme* mit *Pinus silvestris* L., *Picea Abies* (L.) Karst., *Betula verrucosa* Ehrh., *Populus tremula* L. und *Tilia cordata* Mill. ektotrophe Mykorrhizen bilden kann. Die Mykorrhizen gehören zu dem Typus, der »Dn»-Mykorrhizen genannt wird [BJÖRKMAN; vgl. MELIN (1927) und HATCH] und durch die schwarze Farbe, die reichlich ausstrahlenden, groben Hyphen und die besondere netzartige Struktur des Mantels gekennzeichnet ist.

4. Mit *Juniperus communis* L., *Salix caprea* L., *S. repens* L. und *Alnus glutinosa* Gaertn. bildete *C. graniforme* keine typischen Mykorrhizen in den Versuchskulturen. Gewisse Umstände sprechen jedoch dafür, dass Mykorrhizenbildungen unter anderen Umständen nicht ausgeschlossen sind.

5. Die Übereinstimmung der Myzelien in Aussehen und Wachstumsart, ihre Neigung, als Mykorrhizabildner bei Waldbäumen aufzutreten, und das gleichartige Aussehen der dabei gebildeten Mykorrhizen geben unzweideutig einen Beleg dafür, dass das von HATCH aus schwarzen Mykorrhizen von *Pinus silvestris* isolierte *M. R. nigrostrigosum* mit *C. graniforme* identisch ist. Es wird vorgeschlagen, dass man *M. R. nigrostrigosum* als »a provisional and descriptive name» fallen lässt und statt dessen *C. graniforme*, den älteren Namen, anwendet.

6. Als ein denkbarer Anhaltspunkt bei der Beurteilung der systematischen Stellung von *C. graniforme* werden die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen den Hyphenmänteln der *C.*-Mykorrhizen und den Perithecienwänden bei der *Plectascales*-Gattung *Cephalotheca* angeführt.

Literaturverzeichnis.

ARNBORG, T., Der Vallsjö-Wald, ein nordschwedischer Urwald. — Acta Phytogeogr. Suec. XIII, 1940, s. 128.

BJÖRKMAN, E., Om inverkan av ammoniumnitrat på granmykorrhizans utbildning i råhumusmark. — Medd. Stat. Skogsförs.-anst. 30, Stockholm 1937, s. 631.

——, Om mykorrhizans utbildning hos tall- och granplantor, odlade i näringsrika jordar vid olika kvävetillförsel och ljustillgång. (Mycorrhiza in Pine and Spruce Seedlings grown under varied Radiation Intensities in rich Soils with or without Nitrats added.) — Medd. Stat. Skogsförs.-anst. 32, Stockholm 1940, s. 23.

——, Mykorrhizans utbildning och frekvens hos skogsträd på askgödslade och ogödslade delar av dikad myr. (Die Ausbildung und Frequenz der Mykorrhiza in mit Asche gedüngten und ungedüngten Teilen von entwässertem Moor.) — Medd. Stat. Skogsförs.-anst. 32, Stockholm 1941, s. 255.

BULLER, A. H. R., Researches on fungi. Vol. V, London 1933.

CHESTERS, C. G. C., Studies on British Pyrenomycetes 1. The lifehistories of three species of *Cephalotheca* Fuck. — Trans. Brit. Myc. Soc. 19, 1935, s. 261.

FERDINANDSEN, C. & WINGE, Ö., *Cenococcum* Fr. A monographic study. — Den Kgl. Veterinær- og Landbohøjskole, Aarsskrift, København 1925, s. 332.

HATCH, A. B., A jet-black mycelium forming ectotrophic mycorrhizae. — Svensk Bot. Tidskr. 28, Stockholm 1934, s. 369.

LIHNELL, D., Untersuchungen über die Mykorrhizen und die Wurzelpilze von *Juniperus communis*. — Symb. Bot. Ups. III: 3, 1939.

LINDQUIST, B., Om några parasitiska marksvampar i nordsvenska råhumusmarker. — Norrl. Skogsvårdsförb. tidskr., Stockholm 1937.

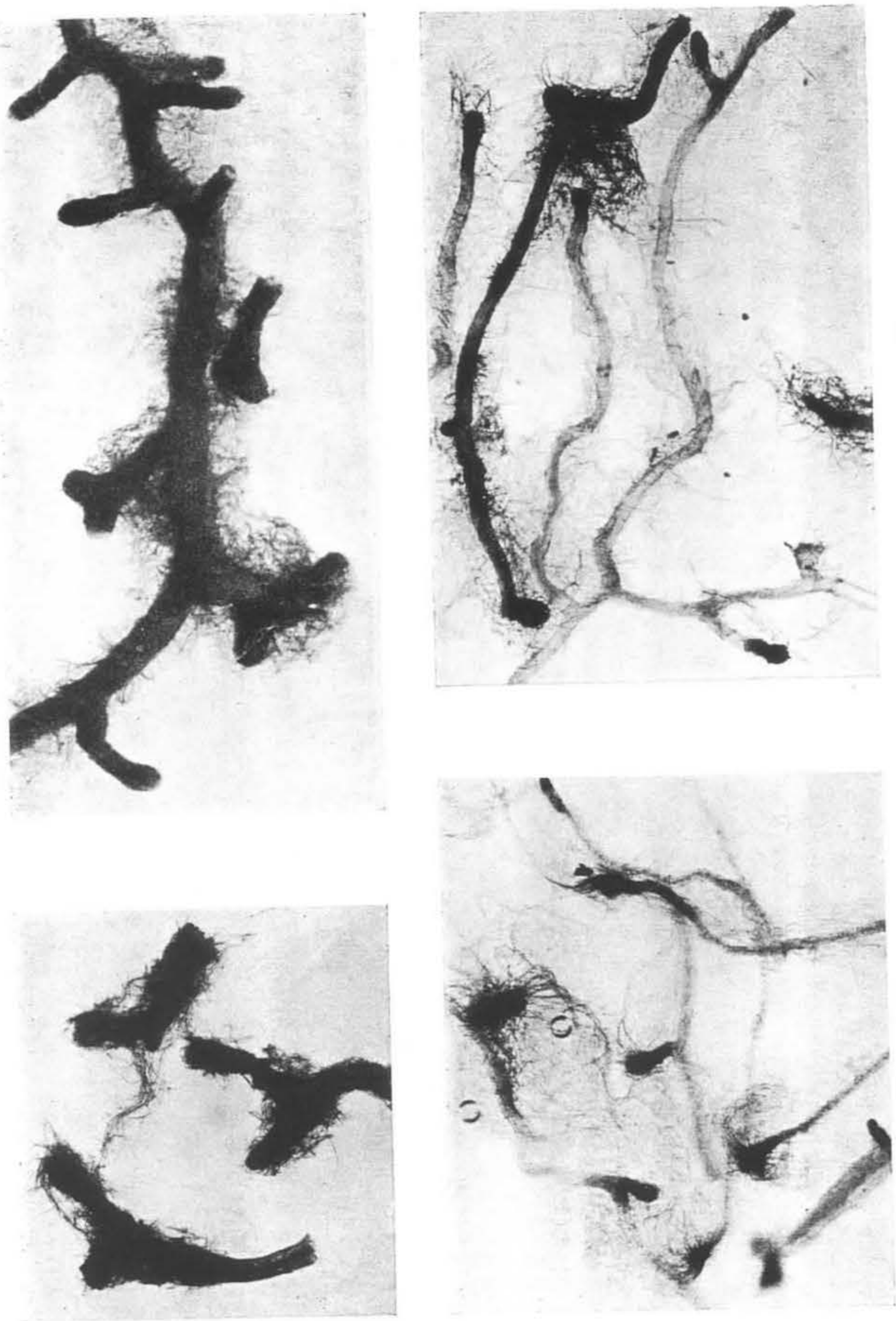
MASUI, K., A study of the ectotrophic mycorrhizae of *Alnus*. — Mem. Coll. Sc., Kyoto Imp. Univ. Ser. B. vol. II, 1926, s. 189.

MELIN, E., Experimentelle Untersuchungen über die Konstitution und Ökologie der Mykorrhizen von *Pinus silvestris* L. und *Picea Abies* (L.) Karst. — Mykol. Unters. u. Ber. 2, 1923.

——, Studier över barrträdsplantans utveckling i råhumus. II. Mykorrhizans utbildning hos tallplantan i olika råhumusformer. (Studien über die Entwicklung der Nadelbaumpflanze in Rohhumus. II. Die Ausbildung der Mykorrhiza bei der Kiefernpflanze in verschiedenen Rohhumusformen.) — Medd. Stat. Skogsförs.-anst. 23, Stockholm 1927, s. 433.

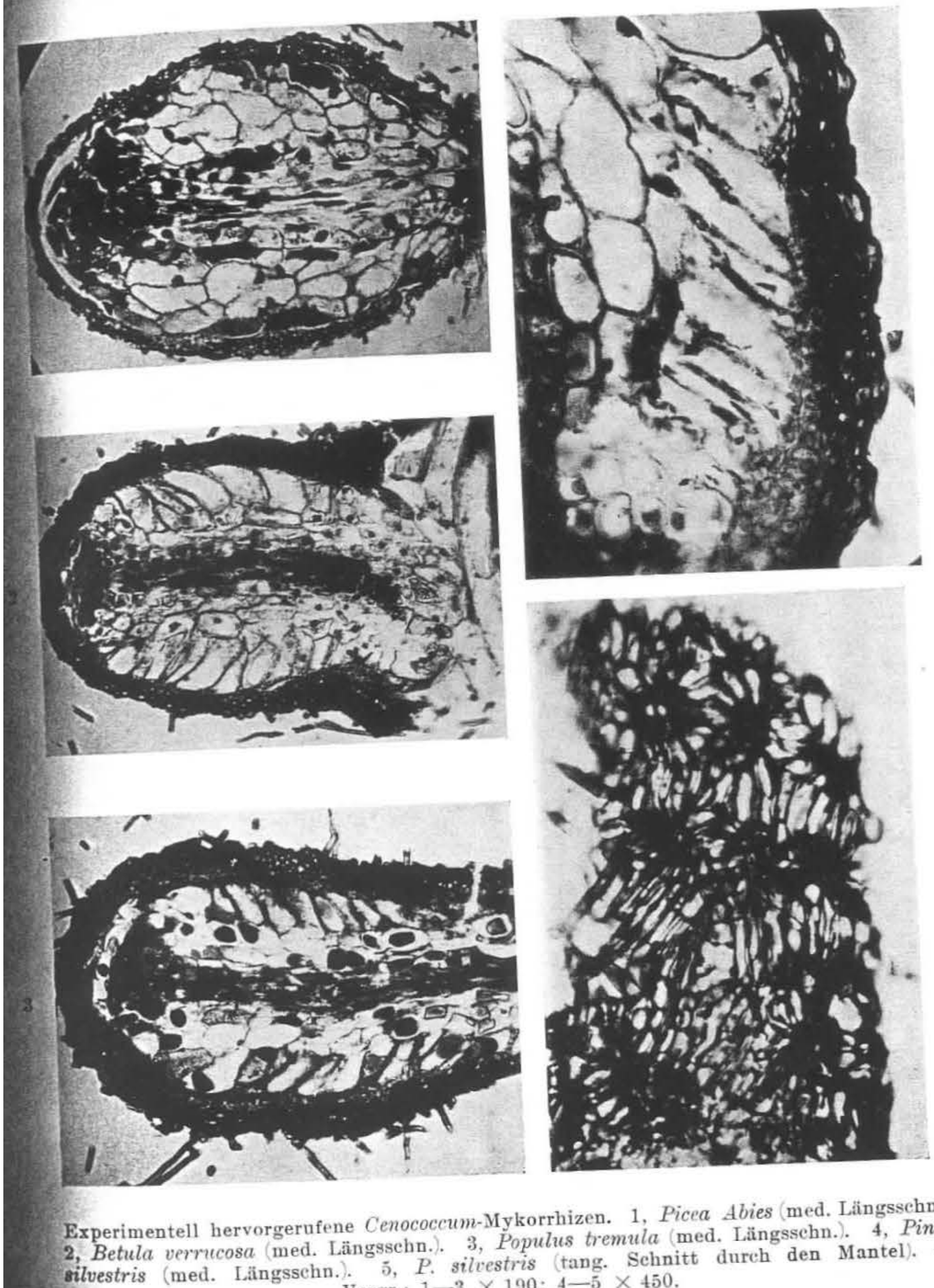
——, Methoden der experimentellen Untersuchung mykotropher Pflanzen. — ABDERHALDEN, Handb. d. biol. Arbeitsmeth. XI: 4, 1936, s. 1015.

SERNANDER, R., Förna och ävja. — Geol. Fören. Förhandl. 40, Stockholm 1918, s. 645.



1 2 3 4

Experimentell hervorgerufene *Cenococcum*-Mykorrhizen. 1, *Pinus silvestris*. 2, *Tilia cordata*. 3, *Betula verrucosa*. 4, *Populus tremula*. — Vergr. × 15.



Experimentell hervorgerufene *Cenococcum*-Mykorrhizen. 1, *Picea Abies* (med. Längsschn.). 2, *Betula verrucosa* (med. Längsschn.). 3, *Populus tremula* (med. Längsschn.). 4, *Pinus silvestris* (med. Längsschn.). 5, *P. silvestris* (tang. Schnitt durch den Mantel). — Vergr.: 1—3 × 190; 4—5 × 450.